

Ein Tropfen Blut genügt:

Reagenzienfreie Labordiagnostik in der Medizin mittels Infrarotspektroskopie



► v.r.n.l. Prof. Dr. W. Mäntele, Direktor des Instituts für Biophysik; Dr. O. Klein, Wissenschaftlicher Mitarbeiter; Dipl.-Phys. G. Hosafci, Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin), Biophysik im Fachbereich Physik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main; Prof. Dr. G. M. Oremek, Leiter des Zentrallabors des Zentrums der Inneren Medizin der Universitätsklinik Frankfurt.

Der erste Schritt beim Arztbesuch oder nach dem Einweisen in eine Klinik besteht fast immer aus der Abnahme von Blut- und Urinproben, die dann im Labor untersucht werden. Während dies in größeren Kliniken im eigenen Labor erfolgt, werden in Arztpraxen oder kleineren Krankenhäusern die Proben meist per Kurier zu einem Labordienstleister verschickt. Aufgrund des zunehmenden Preisdrucks und der Konkurrenz unter den Anbietern werden dabei inzwischen lange Transportwege und damit einhergehend Verzögerungen der therapeutischen Maßnahmen in Kauf genommen. Es wird daher zunehmend der Ruf nach einem point-of-care-testing laut, das direkt am Krankenbett oder auf der Station durchgeführt werden kann und sofort wichtige Blut- oder Urinparameter liefert.

Die vorhandenen Test-Kits sind dafür i.d.R. zu ungenau und zu teuer und werden nur in Ausnahmefällen verwendet. Aber auch im Großlabor besteht ein erhebliches Einsparungspotential. In einer großen Klinik kann die Zahl an täglich zu untersuchenden Blut- und Urinproben in die Tausende gehen. Die Kosten für die Reagenzien der Analysenautomaten, die Kalibrierungen, und die notwendige Arbeitskraft sind ein wichtiger Faktor

bei den Einsparungsmöglichkeiten im Gesundheitswesen.

Die meisten Analysenmethoden für Vollblut, Blutplasma oder Urin arbeiten auf der Grundlage spektroskopischer Bestimmungen im sichtbaren Spektralbereich und im UV, entweder durch direkte Messung einer Pigmentabsorption oder indirekt durch Farbstoff- bzw. Enzymreaktionen mit spektroskopischer Detektion. Der IR Spektralbereich mit Wellenlängen von

ca. 3 μm –20 μm wird bisher nicht eingesetzt, obwohl in diesem Spektralbereich die meisten Inhaltsstoffe von Blut, Urin und anderen Körperflüssigkeiten aufgrund ihrer Molekülstruktur hochspezifische Absorptionsbanden aufweisen. Erste Ansätze gibt es für den Nah-IR-Spektralbereich (ca. 800 nm–3 μm), wo jedoch keine ausreichende Spezifität erreicht wird. Für das mittlere IR gab es bisher Versuche, Proben von Körperflüssigkeiten einzutrocknen und in diffuser Reflexion zu vermessen. Der zusätzliche Aufwand für die Probenvorbereitung und die z.T. auftretenden Nichtlinearitäten bei der Konzentrationsbestimmung schließen jedoch bisher die Anwendung in der Klinik aus.

ckeln, die vom medizinischen Personal leicht benutzt werden kann, die keinerlei Probenvorbereitung benötigt, mit sehr kleinen Probenmengen auskommt, und die dem Arzt wichtige Parameter sofort anzeigt.

Als optisches Interface haben wir Messzellen und Probengeber entwickelt, die das Prinzip der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) nutzen. Diese Methode wurde von uns bereits in GIT 10/2005 im Zusammenhang mit der Messung von Getränkeinhaltsstoffen vorgestellt. Für die medizinische Laboranalytik wurden Miniaturzellen entwickelt, bei der Mikroproben entweder aufpipettiert oder mit einem automatischen Probengeber (Abb. 1) zugeführt werden können.

Mit diesen Probengebern kann in wenigen Sekunden ein IR-Spektrum einer Probe erhalten werden, das die wesentlichen Informationen über die Art und Menge der Inhaltsstoffe enthält. Da eine Probe wie Vollblut, Blutplasma, Urin oder andere Körperflüssigkeiten eine komplexe Matrix darstellt, in der die gleichzeitige Variation verschiedener Parameter erfasst werden

IR-Spektroskopie als neue Analysenmethode im klinischen Labor:

Wir haben vor einigen Jahren mit der Entwicklung von IR-spektroskopischen Verfahren für die Laboranalytik in der Medizin begonnen. Ziel dieser Arbeiten war, eine reagentienfreie Methode zu entwi-

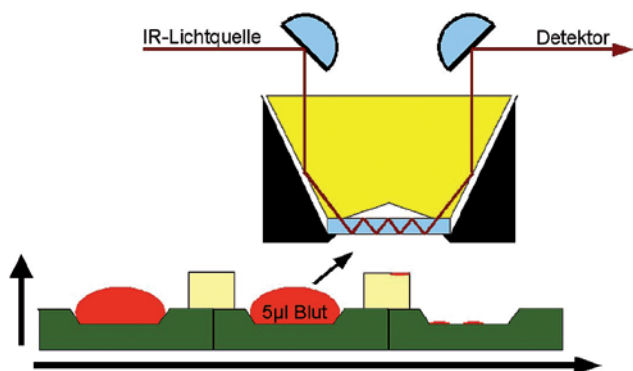


Abb. 1: Automatischer Probengeber für die Serienmessung von Blutproben: Die ATR-Einheit ist fest in das optische System eines kompakten IR-Spektrometers integriert. Der Probengeber wird mittels Horizontal- und Vertikalbewegung so positioniert, dass die einzelnen Proben nacheinander an das optische Interface geführt werden und über Kapillarkräfte den ATR-Kristall benetzen. Zusätzlich können einzelne Probenpositionen mit Reinigungslösungen oder Referenzproben befüllt werden.

muss, werden für die Auswertung multivariate Analysenmethoden (PLS, PCR) eingesetzt.

Kalibrierung der reagenzienfreien Bestimmungsmethode mit Blutproben:

Für die PLS- oder PCR-Regression haben wir mit „realen“ Proben aus dem klinischen Alltag zunächst Kalibriermodelle erstellt. Diese Kalibrierungen für multivariate

Analysenmethoden benötigen ausgewählte Probensätze mit möglichst genau bestimmten Analysenwerten, die die zu bestimmenden Parameter in möglichst breiter Spannweite, d.h. bezüglich der „Normalwerte“ und vor allem der pathologischen Werte repräsentieren. Dieses „Datendesign“ für Kalibrierproben wird häufig vernachlässigt, sodass mit zu vielen „Normalwerten“ ungenaue Kalibrierungen für Extremwerte erstellt

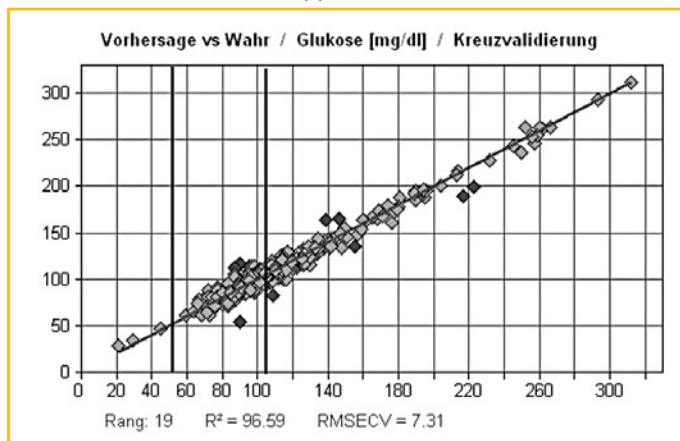
werden. Abschätzungen für das Datendesign ergaben, dass bei etwa 6 klinisch relevanten Parametern und ihrer in der klinischen Praxis vorkommenden Variation mindestens 100 sorgfältig ausgewählte Kalibrierproben benötigt werden, um die Genauigkeit der bisher benutzten Analysenmethoden zu erreichen. Für die Probensätze haben wir Plasmaproben und gerinnungsgemehrte Vollblutproben (EDTA-Blut) ausgewählt, um Kalibriermo-

delle für den Einsatz im klinischen Großlabor und für eine schnelle und direkte Messung auf der Station oder am Krankenbett zu etablieren.

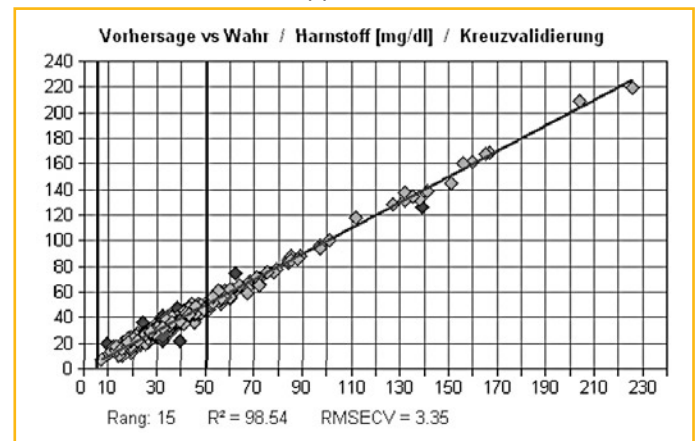
Urin aus der Retorte

Bei der Urinanalyse wurde anders vorgegangen, da hier im klinischen Betrieb meistens nur grobe Klassifizierungen („nicht nachweisbar“, „unter xxx mg/dl“, „über xxx mg/

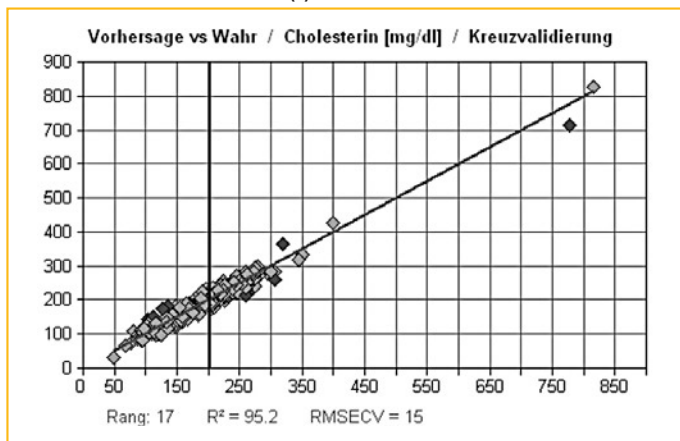
2(a) Glucose,



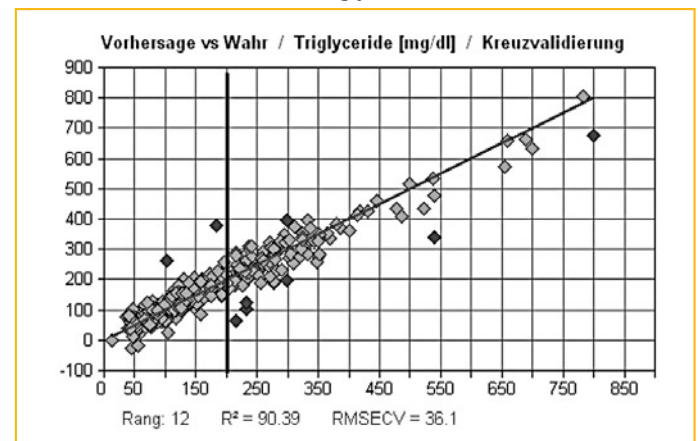
2 (b) Harnstoff



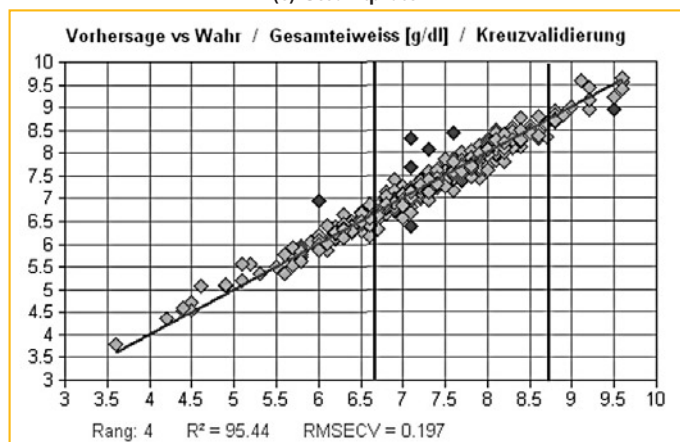
2(c) Cholesterin



2(d) Triglyceride



2(e) Gesamtprotein



2(f) Albumin

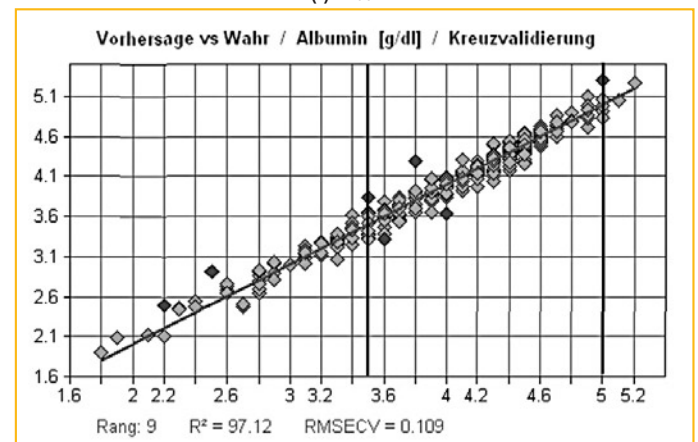


Abb. 2: Korrelationsdiagramme für Blutplasma-Proben. Die vertikalen Balken zeigen die Grenzwerte bzw. die unteren und oberen Normalwerte

Tab. 1: Zusammensetzung der künstlichen Urinproben. Diese Konzentrationsreihen wurden für die IR-spektroskopische Messung so kombiniert, daß jeder Inhaltsstoff für jeden Konzentrationsbereich vor dem Hintergrund der Variation aller anderen Stoffe vorlag.

Konzentration (mg/dl) Inhaltsstoff		niedrig	mittel	hoch
Harnstoff		900	1900	3000
anorg. Phosphor (-PO ₄)		40	90	140
Kreatinin		25	150	260
Ammoniak (als NH ₄ Cl)		50	75	100
Schwefel (als Na ₂ SO ₄)		100	150	200
Protein (als Albumin)		0	1,5	3
Glucose		5	12	20
Harnsäure		35	65	95
Ketonkörper	Hydroxybuttersäure	0	70	140
	Acetoacetat	0	70	140
	Aceton	0	10	20

Tab 2.: Messbereiche und Genauigkeiten (RMSECV) für Vollblut und Blutplasma

	Plasma [mg/dl]		EDTA-Vollblut [mg/dl]	
	Bereich	RMSECV	Bereich	RMSECV
Glucose	20–350	± 7,31	20–340	± 16,7
Harnstoff	5–230	± 3,35	10–220	± 4,5
Cholesterin	50–800	± 15	35–360	± 15,6
Triglyceride	0–800	± 36,1	0–1700	± 21,2
Gesamtprotein	3500–9800	± 197	2000–11000	± 319
Albumin	1600–5200	± 109	1000–6500	± 157

Tab 3.: Messbereiche und Genauigkeiten für Urin

	Bereich [mg/dl]	RMSECV [mg/dl]
Harnstoff	900–3000	± 59,7
Anorg. Phosphor	40–140	± 4,33
Kreatinin	25–260	± 11,7
NH ₄	50–100	± 2,93
Schwefel	100–200	± 4,4
Ketonkörper	0–300	± 20,4
- Hydroxybuttersäure	0–140	± 13,4
- Acetoacetat	0–140	± 7,58

dl“) vorgenommen werden, die für die Erstellung von Kalibriermodellen nicht geeignet sind. Hier wurden mit den wichtigsten Inhaltsstoffen künstliche Urinproben hergestellt, die die Variationsbreite der Inhaltsstoffe über mehrere Größenordnungen abdecken. Die Kalibriermodelle aus diesen Kunsturinen wurden mit ausgewählten „echten“ Urinproben ergänzt und validiert. Die Zusammensetzung dieser „Kunsturine“ zeigt Tabelle 1. Nachdem Kalibriermodelle für Vollblut, Blutplasma und Urin erstellt waren, konnten beliebige Proben vermessen werden. Wir stellen hier die Ergebnisse dieser Messungen in Form von Korrelationsdiagrammen für Blutplasma-Proben vor

(Abb. 2). Dabei ist die mit den etablierten Methoden der klinischen Chemie ermittelte Konzentration auf der Abszisse aufgetragen; die Vorhersage aus der IR-spektroskopischen Analyse auf der Ordinate. Die Streuung der Messwerte liegt zu einem großen Teil an der Fehlerbreite der klinischen Bestimmungsmethode, wie beispielsweise bei der durch Turbidität bei einem Farbtest sehr problematischen Bestimmung hoher Triglyceridwerte.

Tabelle 2 zeigt die Messbereiche und die Genauigkeit unserer Bestimmungsmethode für Blutplasma und für EDTA-behandeltes Vollblut. Derzeit können aus Plasma- und Vollblutproben die Werte für Glucose, Harnstoff, Cholesterin, Triglyce-

ride, Gesamtprotein und Albumin mit klinisch erforderlicher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit bestimmt werden. Bei weiteren Parametern sind die Korrelationen noch nicht hinreichend genau. Auffällig ist die mittlere Abweichung der Glucosebestimmung, die sich bei Vollblutproben deutlich gegenüber den Plasmaproben verschlechtert. Die Ursache für diese Abweichung liegt im Glucosemetabolismus der Zellen, die bei Vollblut den ursprünglichen Glucosewert je nach Zeitdauer zwischen Blutentnahme und Messung reduziert. Werden die Vollblutproben mit Natriumfluorid versetzt, das diesen Metabolismus stoppt, so verbessert sich die mittlere Abweichung für den Glucosewert deutlich. Diese Maßnahme entfällt, wenn die Messung direkt bei der Blutentnahme erfolgt.

Die höchste Genauigkeit wird bei der Bestimmung von Harnstoff erzielt, was angesichts der Relation zwischen Molekülstruktur und Spektrum nicht verwundert. Bei der Bestimmung von Harnstoff und Triglyceriden ist für die Präzision nur noch die Genauigkeit der derzeitigen klinischen Bestimmungsmethode limitierend. Überraschend ist die Zuverlässigkeit, mit der Gesamtprotein und Albumin getrennt werden können, da hier nur minimale abweichende spektrale Merkmale vorliegen. Beide Stoffe sind bei den meisten Krankheiten kovariant. Allerdings konnten wir eine ausreichende Zahl Blutproben von Patienten mit nephrotischem Syndrom in die Kalibrierdaten einbeziehen, bei denen Gesamtprotein und Albumin

weitgehend unabhängig voneinander variieren.

In Tabelle 3 sind die Messbereiche und Genauigkeiten der IR-spektroskopischen Bestimmungsmethode für Urinhaltsstoffe dargestellt. Hier können die Werte für Harnstoff, anorganischen Phosphor, Kreatinin, Ammoniak, Schwefel und Ketonkörper mit einer Genauigkeit bestimmt werden, die den klinischen Anforderungen genügt und sie z.T. übertrifft. Besonders zu erwähnen ist hierbei, dass unsere Methode außer der Angabe der Gesamtkonzentration an Ketonkörper eine weitere Differenzierung nach Hydroxybuttersäure und Acetoacetat ermöglicht. Dies ist beispielsweise beim Krankheitsbild der diabetischen Ketoazidose eine wertvolle zusätzliche Information, bei der die beiden Parameter ein verändertes Verhältnis haben können.

Zusätzlich zu den Inhaltsstoffen, die im physiologischen Normalbereich und im pathologischen Bereich quantitativ bestimmt werden können, haben wir sog. „Schwellenparameter“ definiert, die ab einem bestimmten Wert erfasst werden können und auf bestimmte Krankheiten hindeuten. Beispielsweise kann Glucose im Urin ab etwa 10–20 mg/dl detektiert und damit eine Überschreitung der Nierenschwelle festgestellt werden. Albumin wird ab etwa 100–150 mg/dl erfasst und weist auf eine Makroalbuminurie hin.

Fazit

Es ist uns gelungen, eine einfach zu handhabende reagentien- und verbrauchsmittelfreie Analysenmethode für Blut, Urin und andere Körperflüssigkeiten zu entwickeln, die im Gegensatz zu den etablierten Methoden keinerlei Probenvorbereitung benötigt. Sie kann vor Ort, d.h. am Patienten, eingesetzt werden und erzeugt keine oder nur geringe Abfallmengen. Eine Automatisierung für große Probenzahlen ist möglich. Wir haben die Volumina, die für eine Vollblutanalyse benötigt werden, mit einem Miniatur Diamant-ATR-Kristall bis auf etwa 5 µl reduzieren können.

Damit genügt ein Blutstropfen, wie er z.B. für die Messung mit einem Glucose-Teststreifen für Diabetiker aus der Fingerkuppe entnommen wird, für eine vollständige Bestimmung der in Tabelle 2 aufgeführten sechs Parameter. Der Tropfen kann direkt auf das optische Interface gegeben werden; eine Reinigung ist denkbar einfach.

Selbstverständlich kann die hier beschriebene Analyse auch mit Anreicherungs- und Konzentrationsverfahren kombiniert werden. Damit kann die Detektionsgrenze für die genannten Substanzen weiter reduziert und die Bestimmungsmethode auf weitere Stoffe ausgedehnt werden. Bisher basiert die Messmethode auf Kalibriermodellen, die einige Hundert Proben umfassen. Mit dem klinischen Einsatz können diese Modelle leicht tausende Proben umfassen, sodass die Zuverlässigkeit, Selektivität und Genauigkeit der Methode noch weiter gesteigert werden kann.

Perspektiven:

Wir sehen zum einen direkte Anwendungen für diese Messmethode im klinischen Großlabor, wo sie mit einem Probengeber für die automatisierte Analyse großer Probenzahlen eine deutliche Kostenreduktion verspricht. Bei dieser optischen Methode entfällt zudem die häufige Kalibrierung beim Reagentienwechsel ebenso wie die oft notwendigen Verdünnungsreihen. Eine weitere Anwendung sehen wir direkt auf der Krankenstation, wo vor allem der Zeitvorteil zum Tragen kommt. Aufgrund der sicheren Bestimmung der Glucose liegen auch Anwendungen in Zentren für Diabetiker und Seniorenheimen nahe. Die unkomplizierte Messung von Urinproben ermöglicht auch eine Messung im Durchfluss, beispielsweise durch Kopplung einer geeigneten Durchflussszelle mit einem Urinal, die eine Bestimmung der Urinparameter so einfach und schnell wie das Wiegen oder eine Körperfettbestimmung machen würde – nur wesentlich präziser als die letztere.

Danksagung

Das hier beschriebene F&E Projekt wurde am Institut für Biophysik in Kooperation mit dem Zentrallabor des Zentrums für Innere Medizin des Universitätsklinikums durchgeführt. Die Autoren danken Frau Sauer-Eppel für ihre Hilfe bei der Auswahl und Vermessung der Blut- und Urinproben. Für zahlreiche Anregungen in der Anfangsphase des Projekts danken wir Herrn Prof. Hermann von Lili-

enfeld-Toal, Klinik für Innere Medizin der Main-Kinzig-Kliniken Gelnhausen und Herrn Dr. Frithjof von Gernar, Elté GmbH. Die hier beschriebenen Verfahren und Vorrichtungen sind von der Goethe-Universität in verschiedenen Patentanmeldungen niedergelegt. Die Autoren danken Herrn Dr. Schöller (Innovectis GmbH) für seine tatkräftige Unterstützung bei diesen Schritten.

► KONTAKT

Prof. Dr. Werner Mäntele
Dr. Oliver Klein
Dipl.-Phys. Gamze Hosafci
Institut für Biophysik
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Tel.: 069/798-46410
Fax: 069/798-46423
maentele@biophysik.uni-frankfurt.de
www.uni-frankfurt.de

Prof. Dr. Gerhard M. Oremek
Universitätsklinik Frankfurt
Tel.: 069/6301-5024
Fax: 069/6301-6301
oremek@gmx.net